

ACTION DES DETERGENTS NON IONIQUES SUR L'ULTRASTRUCTURE DE LA VESSIE  
URINAIRE DE RANA PIPIENS L. STIMULEE A L'OCYTOCINE

par Michèle Corriveau

Thèse présentée au Département de Pathologie de la Faculté de Médecine  
de l'Université de Sherbrooke en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
ès-Sciences (biologie cellulaire)

Approbation du jury

Sherbrooke, Québec, Canada, 1971

## SOMMAIRE

Le travail expérimental présenté dans cette thèse concerne le traitement par détergents non ioniques de la membrane apicale de la vessie urinaire de Rana pipiens L.

Les Cémulsols NPT-6 et NPT-10 attaquent les cellules épithéliales. Nous remarquons des altérations morphologiques au niveau de cette face apicale: le coat extracytoplasmique, les granules de sécrétion, les mitochondries et la matrice cytoplasmique subissent des changements qui sont la conséquence de la perte de constituants. L'attaque de la face apicale peut permettre le passage de molécules de détergent causant une inhibition du flux net d'eau, ce qui suggère également une attaque de la double membrane, mais elle ne peut être observée avec les méthodes actuelles. Nos résultats ne permettent pas de conclure à ce sujet.

REMERCIEMENTS

A tous ceux qui, de près ou de loin m'ont aidé à le réaliser, je dédie ce mémoire qui veut marquer le départ d'une nouvelle étape, plutôt qu'un aboutissement. Ma gratitude s'adresse plus spécialement:

aux Docteurs J. Bourguet et J.S. Hugon promoteurs de cette thèse, pour les fructueuses et amicales discussions, les conseils, les encouragements et la véritable collaboration dont ils m'ont honorée tout au long de ce travail,

à Madame E. Hugon, Madame S. Sinave et Monsieur M. Couture qui, avec beaucoup de gentillesse et de compétence m'ont initiée à des techniques très diverses.

En ce qui concerne plus précisément ce mémoire, il m'est agréable de remercier en outre:

le Docteur C. Galéano et tous les membres du jury pour l'attention soutenue et pour les corrections qu'ils ont suggérées d'y apporter,

et Madame D. Ménard qui a collaboré à la dactylographie de ce mémoire.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Schéma de l'appareil

p.5

Tableau des différents traitements

p.7



## TABLE DES MATIERES

	pages
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRES:	
1. MATERIEL ET METHODES.....	4
11. RESULTATS.....	13
111. DISCUSSION DES RESULTATS.....	23
CONCLUSION.....	31
BIBLIOGRAPHIE.....	33
LEGENDES COMMUNES AUX MICROGRAPHIES.....	43
LEGENDES DES MICROGRAPHIES.....	44
MICROGRAPHIES:	
a) MICROGRAPHIES DE VESSIES TEMOINS TRAITEES A L'OCYTOCINE....	54
b) SYSTEME D'ADHESION INTERCELLULAIRE.....	56
c) MICROGRAPHIES OPTIQUES DE VESSIES TRAITEES AUX CEMULSOLS ET DE TISSU STIMULE A L'OCYTOCINE.....	57
d) MICROGRAPHIES DE LA MEMBRANE APICALE DES EPITHELIUMS TE- MOINS ET TRAITES.....	59
e) MICROGRAPHIES DES LESIONS CYTOPLASMIQUES.....	62
f) MICROGRAPHIES DE L'ATTEINTE DES GRANULES SECRETOIRES.....	65
g) MICROGRAPHIES DES MITOCHONDRIES.....	67

## INTRODUCTION

Certaines observations récentes (Bourguet J., données non publiées 1970) indiquent qu'une attaque modérée au moyen de détergents non-ioniques peut entraîner une inhibition marquée et spécifique de la réponse hydrosmotique de la vessie urinaire des amphibiens aux hormones neurohypophysaires. L'action des détergents pouvant aboutir, lorsqu'ils sont utilisés en concentration élevée, à la solubilisation complète des membranes et à la disparition de toute structure de type membranaire, il nous a paru intéressant de rechercher dans quelle mesure une action plus modérée et spécifique, telle que celle observée sur l'épithélium de la vessie, s'accompagnait de modifications décelables tant en ce qui concerne l'ultrastructure cellulaire que les relations entre les différentes cellules.

Différentes particularités intéressantes sont à l'origine d'un emploi fréquent de la vessie urinaire des amphibiens dans l'étude de perméabilité membranaire. Cet organe peut être facilement isolé et possède une structure histologique très simple: il comporte une assise épithéliale unique stratifiée, qui n'est elle-même sous-tendue que par une couche peu importante de tissu conjonctif. Les cellules épithéliales se chevauchent fréquemment; Choi en 1963 démontre que toutes les cellules de l'épithélium muqueux ont au moins un point de contact avec la membrane apicale. Le mode de montage en diaphragme (Bourguet et Maetz, 1961) permet d'isoler facilement de grandes superficies et la préparation ainsi obtenue reste fonctionnelle de nombreuses heures in vitro.

Physiologiquement, la vessie remplit chez les amphibiens deux fonctions. Elle effectue d'une part un transport de sodium à partir du compartiment urinaire et peut d'autre part être le siège d'un flux net

d'eau important. Le transport de sodium résulte d'un processus actif et est à l'origine de la différence de potentiel électrique transépithélial. La perméabilité osmotique à l'eau est déterminée par une zone voisine de la face muqueuse, vraisemblablement la membrane plasmique apicale des cellules épithéliales (Jard, 1966; Bourguet et Jard, 1964; Ussing, 1954). Les mouvements d'eau sont passifs et n'entraînent de flux net que lorsque les deux faces sont baignées par des solutions de pressions osmotiques différentes (Bentley, 1958-1959-1961-1964; Leaf et Coll. 1958; Leaf, 1960). Les hormones neurohypophysaires stimulent aussi bien les deux composantes de la balance hydrominérale: transport de sodium (action natriférique) et flux net d'eau (action hydrosmotique) (Bourguet et Morel, 1967).

On admet généralement que toutes les caractéristiques de perméabilité de la préparation sont déterminées par les membranes apicale et basale des cellules épithéliales.

La membrane plasmique apicale est directement accessible sur toute sa surface et à condition de disposer d'agents dont, soit les dimensions moléculaires, soit la solubilité, limitent l'accès à la seule membrane; on peut espérer interférer uniquement avec cette dernière. Différents types de détergents ont été employés pour solubiliser les membranes et dissocier leurs différents constituants. Ainsi il fut rapporté par Terry et Coll. en 1967, et par Engelman et Morowitz en 1968, que le déoxycholate de sodium et le dodecyl sulfate de sodium produisent un haut degré de séparation des protéines et des phospholipides de la surface des membranes de Mycoplasma Laidlawii. Razin et Barash en 1969, ont suggéré un mécanisme d'action pour le triton X-100 sur les érythrocytes. Ils montrèrent que ce tensioactif à faible concentration (0.5 - 100 mg/1000) inhibe

l'hémolyse hypotonique en augmentant l'hydratation des protéines de la membrane plasmique des érythrocytes.

Certains de ces détergents semblent remplir toutes les conditions pour une attaque spécifique de la membrane apicale. Il s'agit de tensio-actifs insolubles ou peu solubles dans l'eau et dont l'accès au cytoplasme cellulaire est fortement limité par leur caractère lipophile. C'est le cas, par exemple, de certains dérivés de type nonyl phénol polyoxyéthyléné à chaîne courte (par exemple, Cémulsol NPT-6) et qui sont peu solubles dans l'eau.

Il résulte des observations de Zalta et Coll., 1962, que ces détergents non ioniques lysent ou rendent fragiles les membranes cellulaires, ce à un degré variant avec la longueur de la chaîne polyoxyde d'éthylène et de la concentration utilisée. C'est cette action morphologique connue qui nous poussa à l'utilisation des détergents non ioniques pour ces études de perméabilité membranaire.

Mis au contact de la face apicale de la vessie, le NPT-6 inhibe presque complètement la réponse hydrosmotique à l'ocytocine, mais affecte peu le flux net de base et la différence de potentiel électrique transépithéliale.

Nous avons dans ce travail recherché si ces variations de perméabilité s'accompagnaient de modifications ultrastructurales susceptibles de les expliquer.

MATERIEL ET METHODES



### Animaux.

Ce travail a été effectué sur la vessie urinaire de Rana pipiens. Ces animaux sont conservés à jeun dès leur arrivée au laboratoire. Ils sont isolés dans des Erlen-Meyer de 1,000 ml contenant 200 ml d'eau courante. Ces grenouilles sont gardées en chambre froide 2° C et ramenées à la température ambiante une semaine avant leur utilisation.

### Prélèvement et préparation des spécimens.

Après décérébration des animaux, la vessie est rapidement remplie de Ringer. Son montage est facilité par l'insertion de 5 ligatures de fil de soie sur la paroi vésicale. Ces fils permettent ensuite de contrôler la rétraction de la paroi lors de la dissection. Ainsi la vessie peut être montée à la manière d'un diaphragme entre deux chambres de plexiglass (Figure 1).

On isole ainsi dans la même préparation deux éléments identiques dont l'un servira de contrôle et l'autre sera traité au détergent. La face séreuse de la préparation repose sur une toile de nylon, et l'étanchéité du montage est améliorée par un enduit de silicone. Le flux net d'eau étant lié à l'existence d'une différence de pression osmotique entre les milieux baignant les deux faces de l'épithélium, les chambres séreuses sont remplies d'une solution de Ringer (pH 8.1) oxygénée par barbotage d'air et les chambres inférieures sont remplies d'une solution hypotonique: Ringer dilué au vingtième.

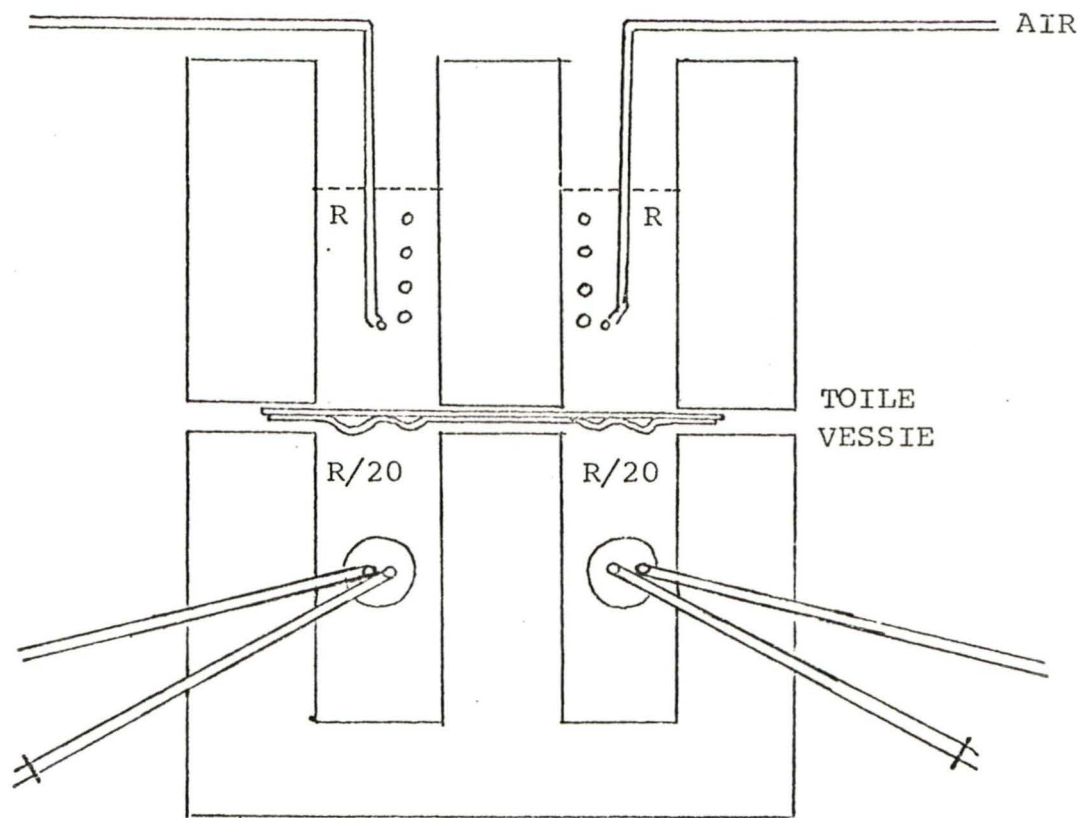
SCHEMA DE L'APPAREIL

Figure 1.



Les chambres inférieures ne communiquent avec l'extérieur que par l'intermédiaire de cathéters insérés dans un bouchon: un cathéter est libre et muni d'une valve, un deuxième est relié à un système d'injection. La pression hydrostatique s'exerçant dans le compartiment muqueux lors de l'insertion de chacun des 2 bouchons, permet de maintenir la préparation en position fixe contre la toile de nylon.

Le flux net d'eau traversant la vessie tend à entraîner une variation de volume dans la chambre inférieure. Ces variations sont détectées et compensées à l'aide d'un dispositif automatique. L'enregistrement sur bloc mémoire du volume injecté en fonction du temps permet une mesure continue du flux net d'eau.

#### Protocole Expérimental.

Après une période d'équilibration d'environ 90 minutes, lorsque le flux de la base est atteint, deux stimulations à l'ocytocine (Syntocinon, Sandoz) sont effectuées. La dose d'hormone est de 10 milli-unités par ml ( $\gamma$ /ml); l'hormone est ajoutée du côté séreux. L'ocytocine entraîne un accroissement du flux net d'eau. Une stimulation dure 15 minutes et est suivie d'un rinçage de la préparation au Ringer, jusqu'au rétablissement du flux de base; à ce moment seulement a lieu la deuxième stimulation.

Après cette stimulation, le détergent étudié est appliqué du côté muqueux, pendant des temps et à des concentrations variables consignés dans le Tableau 1. Ces détergents sont des polymères de l'oxyde

d'éthylène et du phénol de formule  $C_9H_9 - (OCH_2-CH_2)_nOH$  ( $n = 6$  ou  $10$ , Cémulsols NPT-6 ou 10, Société Melles, Bezons, France).

Certaines préparations (dix) ont été fixées immédiatement après traitement au détergent, d'autres (cinq) ont subi une troisième stimulation à l'ocytocine, destinée à apprécier l'intensité de l'inhibition provoquée par le détergent, et n'ont été fixées qu'après rinçage d'environ vingt minutes.

TABLEAU 1

	NPT-6	NPT-10
Temps	5 min.	
	10 min.	10 min.
	70 min.	
Concentrations	1000 $\gamma$ /ml	1000 $\gamma$ /ml
		250 $\gamma$ /ml

### Fixation.

Une seule méthode de fixation est utilisée. Le fixateur employé est le glutaraldehyde 3% dans du tampon cacodylate 0.1 M. La fixation a lieu dans les chambres. La fixation débute par un rinçage des chambres séreuses par ce mélange fixateur. La fixation est renouvelée par addition de 2 ml de glutaraldéhyde tamponné. Durant cette étape, les chambres sont maintenues à la température de la pièce.

Après une durée de 15 minutes, les chambres séreuses et muqueuses sont abondamment rincées au moyen de tampon cacodylate additionné de 7.5% de sucrose. Puis il y a ouverture des chambres et dissection de la préparation; cette opération est suivie d'un lavage des fragments contrôle et traité dans le tampon cacodylate/sucrose pour une durée minimum de 15 heures à 4°C.

### Post-fixation.

La post-fixation est effectuée par le tétroxyde d'osmium tamponné par le véronal acétate, selon Michaelis, utilisé à un pH 7.4. Les spécimens baignant dans cette solution osmiée sont maintenus à l'obscurité et à la température de 4°C pour une heure.

### Deshydratation.

Après la post-fixation en osmium, les spécimens sont déshydratés par des bains successifs dans l'alcool éthylique.

A - Alcool	70%	30 minutes
B - Alcool	90%	30 minutes
C - Alcool absolu	1	15 minutes
	11	15 minutes
	111	15 minutes.

Cette déshydratation se continue par 3 bains successifs de 10 minutes chacun dans l'oxyde de propylène. Les spécimens sont ici encore traités à la température ambiante.

#### Enrobage.

Cette opération débute après le passage du tissu dans le dernier bain d'oxyde de propylène. La vessie est alors plongée dans un mélange à partie égale d'oxyde de propylène et d'épon 812 (Luft, 1961).

Les récipients sont alors mis une heure sur un agitateur muni d'un plateau tournant (appareil de Koshida) à température ambiante. Ces bains sont ensuite déposés sous vide (15 pouces de Hg) pour 15 heures à 22°C.

Le lendemain, huit pièces de 1 mm de côté sont découpées dans chacune des préparations contrôle et traité. Les spécimens sont déposés dans la résine fraîche: Epon préparée dans les proportions 4A/6B. Le tout est alors déposé sur l'agitateur pour environ 4 heures.

Après ce laps de temps, les pièces sont incluses et orientées verticalement dans des gellules de gélatine. La polymérisation débute par un passage de 15 heures sous vide dans une étuve à 45°C; elle est

poursuivie par un passage prolongé, 2 jours ou plus, dans l'étuve, à 60°C.

#### Coupes.

Les coupes sont faites avec un ultratome LKB équipé d'un couteau de verre. Les bacs sont de ruban adhésif et les coupes sont recueillies à la surface d'un bain d'alcool 10%. Les coupes semi-fines (1 - 2  $\mu$ ) sont recueillies au moyen d'une boucle de platine, puis collées sur lame à l'aide d'albumine de Meyer 1%, séchées rapidement. Les coupes fines 600 Å - 1000 Å, coupes grises et dorées sont recueillies sur grilles de cuivre 300 mesh.

Les coupes semi-fines sont examinées au photomicroscope Leitz et les coupes fines sont regardées au microscope Philips EM-300.

#### Colorations.

Nous étudierons sous cette rubrique les procédés de colorations qui fournissent les meilleures informations. Les méthodes de coloration varient suivant le mode d'observation: microscopie optique ou électronique.

##### A) Microscopie optique.

##### 1. Coloration par fuschine basique.

Les coupes semi-fines sont colorées 5 minutes par fuschine basique 1% dissoute dans un mélange 50% d'alcool, 50% d'acétone.



## 2. Coloration de TZITSIKAS - RDZOK - VATTER.

La triple coloration (thionine-azur B - fuschine), méthode de Tzitsikas - Rdzok - Vatter (1961) est effectuée comme suit:

- Bain à l'acétone 1 minute
- Thionine 0.2% H<sub>2</sub>O, pH 3.8 3 minutes sur plaque chauffante 60°C.
- Rincer à l'eau distillée
- Azur B 0.2% dans tampon phosphate à un pH 9 ou 5.5, chauffé 3 minutes
- Rincer à l'eau distillée
- Tremper 1 - 2 minutes dans Macallum's
- Rincer à l'eau distillée
- Déshydrater dans l'alcool 95%
- Laver au xylène et monter.

### B) Microscopie électronique.

1. Double coloration: uranyl acétate - citrate de plomb.

a) Le tissu subit toujours une coloration à l'acétate d'uranium aqueux. Cette coloration est quelquefois effectuée lors de la déshydratation, 0.1% d'uranyl dans l'alcool 70% filtré; cette phase s'effectue à l'obscurité pour 30 minutes.

Une autre possibilité est de post-colorer sur coupes à l'uranyl acétate 5% 1 minute.

b) Dans les deux cas pré-cités, les coupes fines après rinçage

subissent une coloration de 30 secondes au citrate de plomb, selon Reynolds (1963).

2. La coloration au bleu Alcian donna également de bons contrastes des structures polysaccharidiques par rapport au reste du tissu. Elle fut pratiquée selon la méthode de Behnke et Zelander (1970). La coloration est obtenue par addition de 1% de bleu Alcian au fixateur, le glutaraldehyde. Une post-coloration à l'uranyl-acétate et au citrate de plomb augmente le contraste des structures.

RESULTATS



### Contrôles.

Suivant les méthodes de fixation et de coloration, il est possible de distinguer trois types de cellules dans l'épithélium vésical de Rana pipiens L. Ce sont: les cellules à cytoplasme dense, les cellules riches en mitochondries, et les cellules basales.

Les cellules à cytoplasme dense composent plus de 85% de la population totale de l'épithélium. Le terme de cellule granuleuse désigne également ces cellules de forme plus ou moins aplatie, dont le grand axe est parallèle à la face apicale (Figures 1,2,6) (Choi, 1960-1962-1963). Ces cellules granuleuses sont caractérisées par un grand nombre de fibrilles très proches les unes des autres, ce qui confère au cytoplasme cet aspect dense, fortement structuré (Claude, 1961). Cette densité est accentuée par le grand nombre de vésicules cytoplasmiques à contenu dense.

Les mitochondries de forme circulaire, mais présentant un profil allongé en coupe transversale, sont dispersées tout autour du noyau. Le noyau de ces cellules a une ultrastructure similaire à celle de toutes les cellules somatiques de vertébrés. L'enveloppe nucléaire consiste en une double membrane dont le feuillet externe est souvent en contact avec les citernes de l'ergastoplasme, autour desquelles sont dispersés des ribosomes. La fusion des feuilletts interne et externe forme des pores nucléaires. Les deux chromatines peuvent facilement être situées. L'hétérochromatine forme des plages très denses adhérentes au feuillet externe de la double membrane; l'euchromatine trace des sillons plus clairs séparant chacune des plages. L'appareil de Golgi de ces cellules est similaire à celui de plusieurs cellules sécrétrices. Il est com-

posé de trois à cinq citernes flanquées de nombreuses vésicules; le complexe est localisé en position latérale ou supranucléaire.

Les granules de sécrétion sont toujours présents dans les cellules à cytoplasme dense et sont ordinairement situés immédiatement sous la membrane plasmique. Les granules mucigènes sont limités par une membrane extrêmement fine. Ces grains de sécrétion déversent leur contenu en fusionnant à la membrane plasmique fournissant ainsi le matériel extracytoplasmique pouvant être remarqué sur les microvilli. Ce coat est très abondant et particulièrement dense (Bennett et Leblond, 1970; Bradbury et Stoward, 1967; Brandt, 1962; Ito, 1964-1965-1969; Rambourg, 1967; Rambourg et Coll., 1966). Rosen en 1970(a et b), nota que suivant le degré de contraction, il y a accumulation des granules sécrétoires. La vessie de tortue, à l'état contracté, est caractérisée par d'imposants aggrégats de granules de sécrétion.

Une autre catégorie de cellules est représentée par les cellules riches en mitochondries qui forment environ 10% de la population totale (Figures 1,4,5). Ces cellules à cytoplasme clair renferment les mêmes organelles que les cellules denses sauf un nombre plus considérable de mitochondries. Ces mitochondries sont globuleuses, plus volumineuses que celles des cellules denses. Les fibrilles du cytoplasme étant beaucoup plus espacées, on peut observer des arrangements périodiques ou en faisceaux; en outre, la présence de nombreuses vésicules à contenu clair diminue encore la densité cyto-

plasmique. Ce type de cellules possède aussi une forme caractéristique: forme de flacon dont le goulot serait dirigé vers la lumière de la vessie et le corps dirigé vers l'intérieur de l'épithélium. Des corps multivésiculaires ( Figures 24,26) de forme variable, formés quelquefois d'enroulements membranaires créant plusieurs vacuoles internes, sont souvent aperçus dans la région du col. Les granules de sécrétion sont absents dans la région adjacente à la membrane plasmique, mais quelques-uns sont disséminés dans le cytoplasme aux environs des mitochondries.

Le troisième type de cellules observé chez Rana pipiens L. se compose de cellules basales. Ce sont de petites cellules de forme cuboïdale imbriquées à la base des cellules denses et pâles. Elles sont interprétées comme étant des cellules épithéliales indifférenciées; elles n'ont aucun contact avec la lumière vésicale.

La morphologie détaillée de l'ultrastructure vésicale chez Bufo marinus et Bufo bufo a déjà été abondamment décrite par de nombreux chercheurs et ensuite synthétisée par Yamada, 1955, Choi, 1963, et Bentley, 1966. Ils mentionnent un quatrième type de cellules: les cellules à mucus. Après examen de plusieurs centaines de cellules, aucune " goblet cell" ne peut être décelée. Donc ce type cellulaire, si non absent, est pour le moins rarissime chez Rana pipiens L.

Les héli-vessies soumises à deux stimulations d'ocytocine, présentent toutes les modifications ultrastructurales associées à l'augmentation importante de la perméabilité à l'eau que provoque l'hormone antidiurétique sur la vessie des amphibiens. Ces changements furent décrits récemment par Pak Poy et Bentley, 1960, Peachey et Rasmussen, 1961;

de même que par Carasso et Coll., 1962 et Pisam et Coll., 1970.

Les organelles intracytoplasmiques ne semblent pas avoir subi de changements profonds; l'ensemble présente tous les caractères décrits plus haut.

Par contre, les surfaces latérales des cellules sont altérées par les stimulations hormonales. Les espaces intercellulaires se trouvent après stimulation considérablement augmentés, leur dilatation est telle que les digitations qui sont étroitement imbriquées à l'état de repos, arrivent à ne plus s'affronter que par leurs extrémités; les dimensions de ces espaces sont souvent supérieures à celles des plus grandes vacuoles du cytoplasme. Malgré leur grand éloignement, les cellules restent accolées au voisinage de la face muqueuse par la barre terminale ainsi qu'au niveau des desmosomes. Cet élargissement des espaces intercellulaires est accompagné de l'apparition de nombreuses vésicules, dont d'un gonflement général du hyaloplasme par rapport à une vessie à l'état de repos. Il convient de remarquer que les modifications signalées sont proportionnelles à la valeur du flux net d'eau, donc inversement proportionnelles au temps de rinçage après stimulation (Di Bona et Civan, 1969).

#### Morphologie des traités.

Notre étude a porté exclusivement sur l'étude des modifications morphologiques causées par le traitement aux Cémulsols.



Action du NPT-6.

Ce tensio-actif fut étudié à une seule concentration (1000  $\gamma$ /ml) et à plusieurs temps d'action (5,10,90 min.). Aucune différence notable ne peut être signalée en relation avec les variations de temps d'action. Le NPT-6 produit de faibles mais indubitables altérations des cellules granulées et des cellules riches en mitochondries; les cellules basales ne sont aucunement atteintes par ce traitement.

Les espaces intercellulaires se contractent, les digitations s'imbriquent les unes dans les autres. Le nombre de vésicules et vacuoles diminue considérablement, de même que le volume total des organelles membranaires: réticulum, corps multivésiculaires. Des modifications profondes sont observées dans la morphologie des mitochondries. La double membrane mitochondriale est quelque peu distordue, d'une apparence fripée et présente une perte importante de densité de la matrice. Au contraire, les granules de sécrétion situés immédiatement sous la membrane plasmique sont très denses, de forme légèrement elliptique. Nous notons même, chez ce témoin, de larges aggrégats de granules sécrétoires (Figures 11,12,13), ce qui suggère, en accord avec les travaux de Rosen, 1970(a,b) qu'un des mécanismes de protection du tissu contre l'action d'un traitement quelconque soit la contraction. La matrice cytoplasmique est aussi dense que celle des cellules contrôlées. La membrane plasmique, très bien définie, semble intacte sur toute sa surface. La surface filamenteuse extracytoplasmique semble moins abondante et répartie inégalement sur des microvillosités de forme, structure et nombre similaire que chez le tissu contrôlé.

### Action du NPT-10.

Les hémi-vessies furent exposées à deux concentrations de NPT-10 ( 250-1000  $\gamma$ /ml) appliquées du côté muqueux pour un temps de 10 minutes. Ces deux concentrations agissent différemment sur la morphologie des préparations.

#### a) 250 $\gamma$ /ml.

L'exposition du tissu à une solution contenant 250  $\gamma$ /ml de NPT-10, a un effet indubitable sur la morphologie des cellules épithéliales superficielles qui toutes subissent des changements profonds; les cellules basales adjacentes à une lame de tissu conjonctif semblent relativement normales.

Les espaces intercellulaires sont considérablement dilatés, visibles même par microscopie optique ( Figures 14,15). Les digitations amincies, allongées, ne s'affrontent plus que par leurs extrémités en quelques endroits, mais d'autres forment d'énormes vacuoles; les cellules voisines n'ont de points de contact réels que par les barres terminales. La membrane plasmique est toujours bien définie et semble intacte morphologiquement. Le nombre de vésicules, de même que leur volume total, est très inférieur aux conditions du tissu contrôle, mais relativement similaire aux préparations traitées au NPT-6. La double membrane mitochondriale présente également l'aspect fripé et distordu déjà mentionné chez les traités au NPT-6; la matrice est très pâle. La membrane plasmique est toujours bien définie et semble intacte. Le glyco-

calyx est moins abondant et forme de petits amas compacts le long du villus; parallèlement, les granules de sécrétion sont très denses et tracent une ligne bien définie immédiatement sous la double membrane, la vessie est encore à l'état contracté.

b) 1000  $\gamma$ /ml.

La grande caractéristique de ce traitement est l'action zonale du détergent: plusieurs cellules très pâles, quelques autres plus denses, séparées par des cellules à densité presque normale. Morphologiquement, toutes les cellules superficielles subissent des changements profonds, visibles même par microscopie optique. Le pourcentage de cellules lysées étant très important, il nous est impossible de déterminer lesquelles des cellules riches en mitochondries ou des cellules granuleuses sont atteintes en premier lieu. Un point est acquis: les cellules de densité normale intercalées entre les cellules lysées sont toujours de type granulé. Les cellules basales sont relativement normales.

Les cellules les plus altérées présentent un gonflement général du hyaloplasme, accompagné d'une transparence extrême du cytoplasme. Par microscopie électronique, nous remarquons que la membrane plasmique de ces cellules superficielles conserve sa structure en double feuillet même lorsqu'elle est lysée par l'action du détergent. Ce détergent altère sûrement cette membrane, car elle devient perméable à l'eau, ce qui donne lieu à l'oedème du cytoplasme. La cellule devient alors complètement sphérique. Même dans le cas de lésions membranaires, les jonctions cellulaires sont préservées. Ces cellules très pâles comptent peu de

microvilli; seules les cellules de densité relativement normale sont comparables au tissu de contrôle sur ce point, car le nombre de microvilli est associé à l'expansion de la surface apicale. L'oedème cellulaire peut se terminer par l'éclatement de la cellule.

Lorsque la cellule atteint une forme relativement sphérique, le cytoplasme très pâle ne contient plus que des squelettes membranaires, les organelles se vacuolisent, forment des images myéliniques. On reconnaît facilement l'oedème des mitochondries arrivant à former des vacuoles ou des corps multivésiculaires: enroulement de double membrane contenant plusieurs vésicules; les vacuoles peuvent également provenir de l'ergastoplasme. Dans ces cellules lysées, la trame fibrillaire est particulièrement visible, quelques ribosomes libres y sont dispersés ( Figures 19,29). Tout autre organelle cytoplasmique est méconnaissable.

A cette concentration, le noyau subit également certaines altérations. L'enveloppe nucléaire semble être intacte, mais le noyau présente de l'oedème; il augmente de volume et s'arrondit. En même temps, le dessin de la chromatine s'efface, et il est impossible de distinguer hétéro et euchromatine.

Plusieurs cellules superficielles sont apparemment protégées contre l'action lytique des détergents, mais présentent quand même des variations morphologiques comparables à celles observées dans un tissu traité 10 minutes par 250  $\gamma$ /ml de NPT-10.



## Résumé des modifications ultrastructurales.

Ces expériences montrent donc des modifications morphologiques réelles puisque les techniques actuellement employées ne permettent pas de vérifier une modification ultrastructurale de la double membrane plasmique. Nous pouvons résumer nos observations comme suit:

### a) Contrôle après traitement hormonal.

- Gonflement général du hyaloplasme
- Augmentation du nombre et du volume total des organelles membranaires
- Espaces intercellulaires des faces latérales très dilatés
- Préservation des barres terminales et desmosomes

### b) NPT-6.

- Aspect distordu des membranes mitochondriales, pâleur de la matrice
- Densité accrue des grains de sécrétion situés immédiatement sous la membrane plasmique
- Coat moins abondant, inégalement réparti
- Diminution du nombre de vésicules et de leur volume
- Certaines contractions des espaces intercellulaires

### c) NPT-10.

1. 250  $\gamma$ /ml

- Dilatation des espaces intercellulaires
- Nombre et volume des vésicules plus faibles que chez le tissu contrôle
- Aspect fripé de la membrane mitochondriale, matrice de moins en moins dense
- Glycocalyx moins abondant, formant de petits amas sur les microvillosités
- Grains de sécrétion très denses

2. 1000  $\gamma$ /ml.

- Action zonale du traitement: cellules lysées, cellules à densité très faible, séparées par des cellules à densité relativement normale
- Oedème des cellules pâles, du noyau, des mitochondries qui deviennent à peu près sphériques
- Images myéliniques formées par les organelles qui se vacuolisent
- Observation possible de la trame fibrillaire
- Conservation de l'aspect en double feuillet de la membrane plasmique, même s'il y a lésion cellulaire
- Cellules de densité relativement normale présentant les modifications observées lors du traitement à 250  $\gamma$ /ml.

## DISCUSSION

Si les études concernant l'action de nombreuses substances sur les caractères de perméabilité des membranes vivantes ont permis de préciser la notion de site actif sans toutefois identifier ces sites, il est difficile d'obtenir une image cohérente et détaillée de l'ultrastructure du site responsable d'un caractère de perméabilité.

L'étude du mouvement de l'eau et de substances hydrosolubles ou liposolubles a permis à certains auteurs de tirer des conclusions quant à l'ultrastructure de la membrane vivante. L'opinion classique, défendue par Ussing (1954), est que le flux osmotique d'eau est la résultante d'un déplacement en masse de molécules à travers les pores de la membrane. Ce déplacement a lieu lorsque, par suite de la présence d'une substance incapable de franchir la membrane, il y a une différence dans les fractions molaires du solvant.

L'interprétation d'éventuelles variations ultrastructurales reste notamment limitée par la connaissance incomplète que nous avons du mode d'action des différents traitements rendus nécessaires pour examen par microscopie tant optique qu'électronique. Le glutaraldéhyde fut utilisé comme fixateur car selon une étude de Jard et Coll. (1966), il n'entraîne pas une augmentation massive du flux de sodium et maintient une différence de perméabilité à l'eau entre les préparations stimulées à l'ocytocine et les préparations contrôles. Cette fixation précède la déshydratation afin de minimiser les remaniements causés par l'alcool éthylique et le tétroxyde d'osmium.

Notre hypothèse première de l'attaque sélective des cellules muqueuses de la face apicale de la vessie de grenouille par les détergents non ioniques a été vérifiée.

Les expériences que nous venons de décrire montrent que le NPT-6 et le NPT-10, détergents non ioniques, sont des substances capables d'inhiber l'action de l'ocytocine mais affectent très peu le flux de base et la différence de potentiel (Bourguet, données non publiées, 1970). L'apparente réversibilité des variations ultrastructurales et cette stabilité de la différence de potentiel indiquent que les mécanismes de transport de Na et de respiration sont encore intacts durant cette période.

S'il est vrai que certaines molécules présentant une lipophilie marquée ont une action sur les fonctions de perméabilité de la membrane cellulaire, il paraît évident que l'action de ces détergents non ioniques ne dépend pas uniquement de la bonne solubilité dans les lipides. Nous désirions obtenir un effet spécifique sur la membrane plasmique, l'accès du cytoplasme étant supposé être limité par ce caractère de lipophilie; cependant, les lésions ultrastructurales visibles sont surtout intracytoplasmiques. Il est possible qu'elles soient secondaires à un effet membranaire, mais elles pourraient témoigner d'une pénétration cytoplasmique du détergent.

La perte des propriétés de barrière de la membrane plasmique, son incapacité de maintenir les gradients interne et externe, pourraient résulter éventuellement de la perte accidentelle ou de la détérioration d'un système: l'élaboration et la migration des glycoprotéines. Il fut prouvé que le coat résultait de la migration des glycoprotéines à partir du réticulum rugueux vers le Golgi pour ensuite s'acheminer dans les vésicules dispersées dans tout le cytoplasme pour enfin se concentrer en bordure (Bennett, 1970a,b; Fawcett, 1965; Ito, 1969; Rambourg, 1967). Nos



résultats suggèrent qu'il y a eu atteinte de ce système.

Les observations sont en accord avec des études précédemment effectuées sur des bactéries, des érythrocytes et certaines cellules tumorales. Lors d'un traitement de membranes d'érythrocytes par la polylysine, Danon, et Coll. (1965) conclurent que les glycoprotéines établissaient le lien de la double membrane à la polylysine. Mamelak et Coll. (1969) confirmèrent cette hypothèse mais notèrent d'autres liens possibles entre les groupements phosphate et sulfate des phospholipides et des acides polysaccharidiques.

Il peut donc en être de même pour la fixation des détergents aux tissus. La baisse de perméabilité se ferait par une série d'échanges qui réorienterait la structure de la membrane, fermant les canaux aqueux et les réouvrant au fur et à mesure de la récupération, les altérations causées par le NPT-6 étant toutes réversibles.

On connaît la complexité des lésions observées dans les cellules muqueuses de la face apicale. L'histologiste se trouve en présence d'un tableau lésionnel doublement complexe. Dans la même région se trouvent des cellules à des stades fonctionnels et lésionnels très différents. Durant la transition de fonctionnement normal jusqu'à la lyse complète de la cellule, lors de l'emploi de NPT-10, des altérations furent observées au niveau du coat filamenteux extracellulaire, des granules de sécrétion, des mitochondries, de même qu'au niveau de la matrice cytoplasmique. Nous replacerons d'abord nos constatations dans le contexte des travaux récents consacrés aux lésions ultrastructurales provoquées sur différents tissus par quelques traitements.

Quelques travaux récents furent effectués sur l'épithélium vésical. En 1969, Mamelak et Coll. vérifièrent l'action de la poly-L-lysine sur la vessie de crapaud. Ils conclurent que le nombre et la distribution des dommages cellulaires étaient proportionnels au degré d'étirement de la vessie durant l'exposition à la poly-L-lysine. A la phase d'étirement, presque toutes les cellules sont atteintes tandis que lors du stade de contraction, plusieurs cellules exposées au polycation à une concentration de 80  $\gamma$ /ml durant deux heures ne sont pas encore lysées. Ils notèrent également l'apparition de masses denses à la surface apicale mais ne les étudièrent pas en détail. Ils suggérèrent que ces masses consistent en des restes cytoplasmiques et de la polylysine dispersée. Durant ce traitement, le polycation attaque également le coat muqueux de la surface apicale qui forme de minuscules amas ou disparaît complètement. La polylysine peut également avoir pénétré le bagage lipoprotéique de la membrane plasmique apicale, rompant ainsi l'arrangement moléculaire, ce qui cause une augmentation de perméabilité de la membrane aux constituants cytoplasmiques solubles.

Les changements des organites intracellulaires sont la conséquence de la perte de constituants. L'attaque de la surface apicale par ce polymère peut aussi avoir causé le relargage d'enzymes lysosomiales (protéases, lécithinases...) qui attaquent les organites. En dépit de la lyse de plusieurs cellules de la couche superficielle, la membrane plasmique demeure intacte, toujours composée du double feuillet, de même que le complexe jonctionnel.

La membrane plasmique occupe la position la plus vulnérable de l'environnement extra et intracellulaire; de ce fait elle joue un rôle critique dans la protection cellulaire. Cette double membrane atteinte

la cellule perd sa capacité de maintenir son volume: ceci entraîne l'agonie cellulaire par lésions irréversibles et progressives de tous les organites.

Saladino et ses collaborateurs (1969) étudièrent les modifications de la membrane plasmique de la vessie produites par un antibiotique polyène: amphotéricine B. Ils notèrent une sensibilité différente des cellules pâles et des cellules denses à l'amphotéricine B. Ceci fut associé à l'augmentation rapide du transport actif de Na, suggérant que chacun de ces deux types cellulaires peut jouer un rôle différent dans le transport de l'eau et des ions. Les cellules pâles sont attaquées les premières après huit minutes d'exposition à l'antibiotique, mais après deux heures, toutes les cellules sont gonflées et altérées. Ils notèrent que les mitochondries étaient également très gonflées et contenaient de nombreux cristaux arrondis et denses identifiés comme étant des sels de calcium. Peachey et Rasmussen (1961) arrivèrent à la conclusion que les mitochondries de vessie de grenouille pouvaient accumuler des ions de calcium, barium, strontium et d'or. Dans ces cas les granules intra-mitochondriaux présentent une densité électronique très élevée. Le réticulum rugueux, le complexe golgien et les espaces intercellulaires apparaissent distendus. Le noyau est également gonflé et quelquefois, ils notent que la chromatine s'amasse en plages denses. Rosen (1970 a,b) confirma ces observations par l'étude du même traitement appliqué à l'épithélium vésical de tortue. L'amphotéricine B produit un progressif mais irréversible oedème du cytoplasme de tous les organites. Les altérations semblent résulter d'une perturbation du système normal d'échange Na-K à la surface cellulaire (Finn, 1970), causant une pénétration de l'eau du milieu environnant.



Des séries d'expériences furent également effectuées avec certains tensio-actifs, dans le but de détériorer sélectivement les membranes. Certains de ces détergents, l'attaque sélective de certains composants cellulaires, dépendent en grande partie des dimensions moléculaires et de la solubilité du détergent. Fiszer et de Robertis (1967), Berger et Fand (1967), et Miller (1970) utilisèrent le Triton X-100 afin de solubiliser des enzymes de membranes limitantes. Les résultats démontrent qu'il y a activation maximale et solubilisation des Na - K - ATPase à une concentration de 0.1% de détergent. Swanson et Coll. (1964), par des études sur les microsomes cérébraux, avaient déjà démontré, qu'utilisés à certaines concentrations, les détergents causaient non seulement la solubilisation, mais également une activation considérable de ces enzymes. L'expérience fut réussie avec le Lubrol W à 0.05% de concentration. Certains détergents non ioniques furent également utilisés: le polyéthylène glycol "400" (Schoffeniels et Coll. 1962; Kover et Coll. 1971), le pluronic F-68 (Rozé, 1966), le déoxycholate de sodium et le dodecyl sulfate de sodium (Engelman et Coll. 1967; Emmelot et Vaz Dias, 1970).

Le "pluronic F-68" protège partiellement les hématies contre l'hémolyse osmotique aux concentrations inférieures à 5%. Au delà de cette concentration, des altérations cellulaires importantes surviennent avec agglutination et quasi disparition des membranes. Engelman et Coll (1967), Razin et Barash (1969) rapportèrent que le déoxycholate de sodium, le dodecyl sulfate de sodium et le Triton X-100 produisent un haut degré de séparation des protéines et des phospholipides de la surface des membranes de Mycoplasma laidlawii, tandis qu'Emmelot et Vaz Dias (1970), en utilisant les mêmes détergents montrèrent que les membranes reconstituées par

dialyse après action sur les membranes plasmiques de foie sont bien différentes des membranes normales au point de vue contenu protéique, lipidique et en cholestérol.

Des altérations ultrastructurales semblables ont été observées par plusieurs chercheurs dans d'autres tissus après différents traitements. En 1966, Parturier-Albot étudiait les lésions ultrastructurales causées par intoxication alcoolique sur le foie de rat et le foie humain. Il nota des anomalies des hépatocytes portant sur tous les organites de la cellule. Seuls les noyaux semblent normaux. Les modifications les plus frappantes sont celles des mitochondries qui sont déformées, parfois même géantes; elles sont souvent accolées à trois ou quatre et prennent un aspect flétri. D'une manière générale, leurs crêtes sont très rarifiées et courtes, la matrice a perdu son homogénéité. Parturier-Albot nota également que le réticulum lisse était vacuolé; dans certains hépatocytes, il distingua nettement des vacuoles et vésicules golgiennes particulièrement hypertrophiées, remplies d'une substance très dense aux électrons. Les membranes paraissent intactes, bien qu'il observe une dilatation généralisée des espaces intercellulaires.

Egalement en 1966, Schaffner et Javitt notèrent plusieurs changements une heure après l'injection de tauroolithocholate dans les cellules hépatiques. Les plus importants sont ici la disparition de la presque totalité des microvilli du canal biliaire et une dilatation du complexe golgien. Ces organites sont considérés par Schaffner comme étant les points d'attaque, mais il nota plusieurs autres modifications ultrastructurales suivant ces premières altérations: la dilatation du canal biliaire, la formation de vacuoles autophagiques, la rupture du

réticulum rugueux et des altérations des membranes mitochondriales. Il considéra ces changements comme étant le résultat de la rétention de la bile et du tauroolithocholate dans les hépatocytes. Un troisième groupe de changements est l'apparente régénération de l'ergastoplasme par la condensation des polyribosomes et la réapparition des microvilli.

Cassidy et Tidball (1967) notèrent une augmentation de perméabilité de l'épithélium intestinal du rat après traitement par agents chélateurs (Na EDTA). En même temps que cet accroissement de perméabilité, le contenu de la muqueuse en ion Ca et Na décroît beaucoup. Des électromicrographies des tissus traités in vivo avec la Na EDTA révèlent:

- a) des microvilli arrondis et gonflés dans la région du complexe jonctionnel,
- b) un élargissement du canal intercellulaire, particulièrement dans la région de la zonulae adherentes,
- c) la perte de certains détails dans la région des desmosomes.

Ils expliquèrent l'action des agents chélateurs comme suit: l'élimination des ions Ca et Na semble être en relation directe avec le transport des fluides en général et permet un mouvement du Na dans la cellule. L'activité de la pompe à sodium fut décrite par Farquhar et Palade (1963) comme étant localisée le long des faces latérales de la cellule épithéliale. De par cette démonstration, ils trouvent l'explication de toutes les modifications membranaires observées au niveau du complexe jonctionnel.

Après cette courte revue des diverses lésions observées dans d'autres tissus que nous avons mis en relation avec les modifications produites par les Cémulsols, nous tenterons une hypothèse explicative des changements morphologiques observés.

CONCLUSION



Nous voyons que le nombre et la distribution des dommages cellulaires sont bien proportionnels à la solubilité et à l'encombrement stérique des molécules de détergents: le NPT-6 attaque les cellules, altère les organites, mais le NPT-10 en plus, cause littéralement un éclatement de plusieurs cellules. Durant le traitement, le polymère attaque le coat muqueux de la surface apicale qui forme alors de minuscules amas ou disparaît complètement. Cette première étape franchie, les molécules peuvent dissocier la couche lipoprotéique de la membrane plasmique apicale, et en modifier l'arrangement moléculaire: ceci pourrait produire une perméabilité accrue de la membrane vis-à-vis des macromolécules cytoplasmiques et de l'eau. Le résultat final est la perte de densité de la matrice cytoplasmique.

Nos résultats montrent que le NPT-6 et le NPT-10 produisent une inhibition importante de l'effet de l'ocytocine sur le flux net d'eau. Cette inhibition sous-entend la détérioration de l'action d'un intermédiaire de l'AMP cyclique sur la membrane apicale ou une restriction imposée par une réduction du gradient osmotique effectif, ceci à cause d'une élévation dans la perméabilité du soluté cytoplasmique à la surface de la membrane apicale de la vessie de grenouille. Une hypothèse de travail est le blocage par le polymère d'un nombre appréciable de molécules d'eau; on peut supposer que la précipitation des protéines est due, au moins partiellement, à une dénaturation par extraction de l'eau liée aux chaînes polypeptidiques.

Les changements intracellulaires sont la conséquence de la perte de constituants. L'attaque de la surface apicale peut permettre le passage de molécules de détergent qui alors attaquent la membrane



des lysosomes, augmentant la perméabilité, permettant peut-être le relargage d'enzymes lysosomiques (hydrolases, phosphatases, protéases et lécithinases...) qui attaquent les organites. Les masses denses rassemblées dans la région immédiatement sous-jacente à la double membrane, consisteraient donc probablement en des granules polysaccharidiques chargés de restes cytoplasmiques, et peut-être de quelques molécules de détergent. Parallèlement à l'hypothèse de Peachey et Rasmussen (1961), si les mitochondries peuvent capter les ions de calcium, de barium et d'or, peut-être captent-elles ici des molécules de détergent qui établiraient des liens entre les groupements phosphate et sulfate des phospholipides et des acides polysaccharidiques du système membranaire, d'où réorientation des structures membranaires, changement de perméabilité, et finalement perte de densité de la matrice mitochondriale.

Il faut en outre, remarquer que les NPT-6 et NPT-10 interfèrent avec l'ocytocine quant à l'effet sur le flux net d'eau. S'agit-il d'une véritable compétition? Nos résultats ne permettent pas de conclure à ce sujet. Néanmoins, ils suggèrent que la perte des propriétés de barrière de la membrane plasmique résulte du mal fonctionnement d'un système: l'élaboration et la migration des glycoprotéines. Pour être certain des lieux d'attaque et d'accumulation des détergents, peut-être que l'utilisation de matériel marqué fournirait des informations complémentaires.

BIBLIOGRAPHIE

BEHNKE O., and ZELANDER T.

Preservation of intercellular substances by the cationic dye Alcian in preparation procedure for electron microscopy.

J. Ultrast. Res. 31, 424-438, 1970.

BENNETT G.

Migration of glycoprotein from Golgi apparatus to cell coat in the columnar cells of duodenal epithelium.

J. Cell Biol. 45, 668, 1970.

BENNETT G., and LEBLOND C.P.

Formation of cell coat material for the whole surface of columnar cells in the rat small intestine, as visualized by radioautography with L-fucose-3H.

J. Cell Biol. 46, 409, 1970.

BENTLEY P.J.

The effect of neurohypophyseal extracts on water transfer across the wall of the isolated urinary bladder of Toad Bufo Marinus.

J. Endocrin. 17, 201-209, 1958.

BENTLEY P.J.

The effect of ionic changes on water transfer across the isolated urinary bladder of the Toad Bufo Marinus.

J. Endocrin. 18, 327-333, 1959.

BENTLEY P.J.

Directional differences in the permeability to water of the isolated urinary bladder of the Toad Bufo Marinus.

J. Endocrin. 22, 95-100, 1961.

BENTLEY P.J.

Physiological properties of the isolated frog bladder in hyperosmotic solutions.

Comp. Biochem. Physiol. 12, 233, 1964.

BENTLEY P.J.

The physiology of the urinary bladder of amphibia.

Biol. Rev. 41, 275, 1966.

BERGER I.B., and FAND I.

The effect of formaldehyde fixation and Triton X-100 on lysosomal activation in cultured Chang liver cells.

An. Histochem. 12, 355-361, 1967.

BLOOM J., and FAWCETT S.

A textbook of Histology.

W.B. Saunders Co., Philadelphia-London-Toronto, 1969.

BOURGUET J., et MAETZ J.

Arguments en faveur de l'indépendance des mécanismes d'action de divers peptides neurohypophysaires sur le flux osmotique d'eau et sur le transport actif de sodium au sein d'un même récepteur.

Biochem. Biophys. Acta 52, 552-565, 1961.

BOURGUET J., et JARD S.

Un dispositif automatique de mesure et d'enregistrement du flux net d'eau à travers la peau et la vessie des amphibiens. Biochem. Biophys. Acta 88, 442-444, 1964.

BOURGUET J., et MOREL F.

Indépendance des variations de perméabilité à l'eau et au sodium produite par les hormones neurohypophysaires sur la vessie de grenouille. Biochem. Biophys. Acta 135, 693-700, 1967.

BRADBURY S., and STOWARD P.J.

The specific cytochemical demonstration in the Electron Microscope of Penodate-Reactive mucosubstances and polysaccharides containing Vic-glycol groups. Histochemie 11, 71, 1967.

BRANDT P.W.

A consideration of the extraneous coats of the plasma membrane. Circulation 26, 1075, 1962.

CARASSO N., FAVARD P., BOURGUET J. et JARD S.

Rôle du flux net d'eau dans les modifications ultrastructurales de la vessie de grenouille stimulée à l'ocytocine. J. Micros. 5, 519-522, 1966.

CASSIDY M.M., and TIDBALL J.

Cellular mechanism of intestinal permeability alterations produced by chelation depletion. J. Cell Biol. 32, 685-698, 1967.

CHOI J. K.

Electron microscopic study on the transitional epithelium of toad bladder.

J. Appl. Physics 31, 1632, 1960.

CHOI J. K.

Light and electron microscopy of toad urinary bladder.

Anat. Rec. 142, 222, 1962.

CHOI J. K.

The fine structure of the urinary bladder of the toad Bufo  
Marinus.

J. Cell Biol. 16, 53, 1963.

CLAUDE A.

Mise en évidence par microscopie électronique d'un appareil fibrillaire dans le cytoplasme et le noyau de certaines cellules.

C.R.Ac.Sc. 253, 2251, 1961.

DANON P., HOWE C., and LEE L.T.

Interaction of polylysine with soluble components of human erythrocyte membranes.

Biochim. Biophys. Acta 101, 201-207, 1965.

DIBONA D.R., and CIVAN M.M.

Toad urinary bladder: intercellular spaces.

Science 165, 503, 1969.

DIBONA D.R., CIVAN M.M., and LEAF A.

The anatomic site of the transepithelial permeability barriers of toad bladder.

J. Cell Biol. 40, 1, 1969.



EMMELOT P., and VAZ DIAS H.

Separation of membrane components produced by anionic detergents  
acid maintained after the latter's removal.

Biochim. Biophys. Acta 203, 172-175, 1970.

ENGELMAN D.M., and MOROWITZ H.J.

Characterization of plasma membrane of M. laidlawii.

Biochim. Biophys. Acta 150, 376, 1968.

FARQUHAR M.G., and PALADE G.E.

Junctional complexes in various epithelia.

J. Cell Biol. 17, 375, 1963.

FAWCETT D.W.

Surface specializations of absorbing cells.

J. Histochem. Cytochem. 13, 75, 1965.

FINN A.L.

Effect of potassium and amphotericin B on ion transport in  
the toad bladder.

Am. J. Physiol. 218, 463-469, 1970.

FISZER S., and DE ROBERTIS E.

Action of Triton X-100 on ultrastructure and membrane-bound  
enzymes of isolated nerve endings from rat brain.

Brain Res. 5, 31-44, 1967.

ITO S.

The surface coating of the glycocalyx.

Fed. Proc. 143, 294, 1964.

ITO S.

The enteric surface coat on cat intestinal microvilli.

J. Cell Biol. 27, 3, 475, 1965.

ITO S.

Structure and function of glycocalyx.

Fed. Proc. 28, 1, 12, 1969.

JARD S., BOURGUET J., FAVARD P., and CARASSO N.

The role of intercellular channels in transepithelial transfert of water and sodium in the frog urinary bladder.

J. Membr. Biol. 4, 129-147, 1971.

KOVER G., TERCAFS R.R., et SCHOFFENIELS E.

Différence de potentiel et flux net d'eau au niveau de la peau isolée de grenouille; influence du polyethylene-glycol "400".

Archives Internationales de Physiologie et Biochimie 71, 588-593, 1963.

LEAF A., ANDERSON J., and PAGE L.B.

Active sodium transport by the isolated toad bladder.

J. Gen. Physiol. 41, 657-668, 1958.

LEAF A.

Some actions of neurohypophysical hormone on a living membrane.

J. Gen. Physiol. 43, 5 (suppl.) 175-189, 1960.

LUFT J.

Improvements in epoxy resin embedding methods.

J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409, 1961.

MAMELAK M., WISSIG S.L., BOGOROCH R., and EDELMAN I.S.

Physiological and morphological effects of poly-L-lysine  
on the toad bladder.

J. Membrane Biol. 1, 144-176, 1969.

MILLER D.M.

Total solubilization of erythrocyte membranes by nonionic  
detergents.

Biochem. Biophys. Res. Com. 40, 716-722, 1970.

PAK POY R.F.K., and BENTLEY P.J.

Fine structure of the epithelial cells of the toad urinary  
bladder.

Exp. Cell. Res. 20, 235, 1960.

PEACHEY L.D., and RASMUSSEN H.

Structure of the toad's bladder as related to its physiology.

J. Biophys. Biochem. Cytol. 10, 529, 1961.

PARTURIER-ALBOT U.M.

The toxic effect of alcohol on the human liver and its first  
ultrastructural manifestations.

Am. J. Gastroenterol. 48, 319-326, 1967.

PISAM M., RIPOCHE P., et RAMBOURG A.

Etude ultrastructurale des charges négatives de la surface api-  
cale de l'épithélium vésical de la grenouille; leurs modifi-  
cations sous l'action de l'ocytocine.

C.R. Acad. Sc. Paris 271, 105-107, 1970.

RAMBOURG A.

Détection des glycoprotéines en microscopie électronique.

C.R. Acad. Sc., Paris 265, 1426, 1967.

RAMBOURG A., NEUTRO M. and LEBLOND C.P.

Presence of a "Cell Coat" rich in carbohydrate at the surface of cells in the rat.

Anat. Rec. 154, 41, 1966.

RAZIN S., and BARASH Y.

Solubilization of mycoplasma membranes by the nonionic detergent Triton X-100.

FEBS Letters 3, 217-220, 1969.

REYNOLDS E.S.

The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.

J. Cell Biol. 17, 208, 1963.

ROSEN S.

The turtle bladder.

1. Morphological studies under varying conditions of fixation.

Exp. Mol. Path. 12, 286-296, 1970a.

ROSEN S.

The turtle bladder.

11. Observation on the epithelial cytotoxic effect of amphotericin B.

Exp. and Mol. Path. 12, 297-305, 1970b.

ROZE C.

Comportement osmotique des hématies dans des solutions d'un détergent non ionique: le "Pluronic F-68".

C.R.Acad. Sc., Paris 263, 1615-1618, 1966.

SALADINO A.J., BENTLEY P.J., and THUMP B.F.

Effect of amphotericin B on the ultrastructure and function of the epithelial cells of the toad bladder.

Am. J. Pathol. 54, 421-465, 1969.

SCHAFFNER F., and JAVITT J.

Morphologic changes in hamster liver during intra-hepatic cholestasis induced by tauroolithocholate.

Lab. Invest. 15, 1783-1792, 1966.

SCHOFFENIELS E., GILLES R., et DANDRIFOSSE G.

Action des détergents et du calcium sur le potentiel électrique de la peau de grenouille isolée.

Arch. Inter. Phys. et Bioch. 70, 335-344, 1962.

SWANSON P.D., Mc ILLWAIN H., and BRADFORD H.F.

Stimulation and solubilization of sodium ion-activated adenosine triphosphatase of cerebral microsomes by surface-active agents; specially polyoxyethylene ethers: actions of phosphatases and neuramidases.

J. Biochem. 92, 235-247, 1964.



TERRY T.M., ENGELMAN D.M. and MOROWITZ H.J.

Separation of lipid from mycoplasma membrane when treated  
with sodium dodecylsulfate.

Biochim. Biophys. Acta 135, 381, 1967.

TZITSIKAS H., RDZOK E.J., and VATTER A.E.

Staining procedures for ultrathin sections of tissues embedded  
in polyester resin.

Stain Technol. 36, 355-360, 1961.

USSING H.H.

Membrane structure as revealed by permeability studies.

Colston Peper, Butterwoths, London 1954.

YAMADA E.

The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse.

J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 445, 1955.

ZALTA J.P., ROZENCWAJG R., CARASSO N., et FAVARD P.

Isolement d'une fraction de noyaux cellulaires.

C.R.Acad. Sc. 255, 412, 1962.

LEGENDES COMMUNES aux ILLUSTRATIONS de MICROSCOPIE

bt	: barre terminale
C	: coat, couche extracytoplasmique
Cgr	: cellule granulée
Cm	: corps multivésiculaire
Cp	: cellule pâle
de	: desmosome
di	: digitation
ei	: espace intercellulaire
fc	: fibre conjonctive
gr	: granule
m	: mitochondrie
mv	: microvilli
N	: noyau
RE	: réticulum endoplasmique
v	: vacuole
Za	: zonula adherens

LEGENDES des PHOTOS

## A- Micrographies de vessies témoins traitées à l'ocytocine.

1. Vessie de grenouille stimulée par l'ocytocine 10  $\gamma$ /ml.  
Vue de l'épithélium vésical. Les espaces intercellulaires sont dilatés; une cellule riche en mitochondries occupe l'extrême gauche; les noyaux sont de forme allongée.  
X 12215
  
2. Cellule dense ou cellule granulée.  
Matrice cytoplasmique dense, les mitochondries sont localisées en position supranucléaire; les citernes du réticulum endoplasmique paraissent remplies d'un matériel légèrement granuleux; les granules de sécrétion sont localisés dans la région sous-jacente à la membrane plasmique apicale. La couche extracytoplasmique a très fortement fixé le colorant.  
X 38745
  
3. Cellule pâle.  
Le hyaloplasme est relativement clair; le réticulum endoplasmique est très développé, surtout formé de vésicules claires; on distingue facilement le matériel fibrillaire en certains endroits (—→)  
X 25730

4. Deux types de cellules apparaissent sur cette photo: cellule granulée ou dense et cellule pâle. Les espaces intercellulaires sont dilatées mais les cellules restent étroitement accolées dans la région de la barre terminale.  
X 10260
5. Cellule pâle.  
Ce type de cellule est caractérisé par le grand nombre de vésicules pâles. Noter le noyau allongé, les mitochondries denses, la situation des granules de sécrétion immédiatement sous-jacents à la membrane plasmique; nous apercevons également le matériel fibrillaire (—→)  
X 10260
6. Cellule dense.  
Le noyau est toujours de forme allongé, mais le hyaloplasme est très dense et le réticulum endoplasmique moins développé.  
X 10260

B- Système d'adhésion intercellulaire.

7. Détails de relations entre cellules voisines au niveau des desmosomes (macula adherens); les cellules restent accolées au niveau de ce système vers lequel convergent des tonofibrilles. Cette préparation fut colorée par addition de 1% de bleu Alcian, au glutaraldéhyde (Behnke, 1970). Une post-coloration à l'uranyl-acetate et au citrate de plomb améliore le contraste de toutes nos préparations.  
X 27060

8. Dans la zone voisine de la lumière, les cellules voisines adhèrent par les doubles membranes latérales, formant des lignes très denses: barre terminale (zonula occludens). Un peu plus loin les membranes se séparent, l'espace intercellulaire s'agrandit formant la zonula adhérens. Noter la bande continue de matériel amorphe, disposée parallèlement à la double membrane (voir figure 22).

X 27060

9. Au niveau des contacts latéraux de deux cellules épithéliales, les interdigitations retiennent quelque peu les deux cellules adjacentes, mais les espaces intercellulaires sont dilatés sous l'action de l'ocytocine. La barre terminale (zonula occludens) étant imperméable à l'action de l'ocytocine et du détergent, demeure intacte.

X 11070

C- Micrographies optiques de vessies traitées aux Cémulsols et de tissu stimulé à l'ocytocine.

10. Epithélium traité au NPT-6, 1000  $\gamma$ /10 min.  
Vessie contractée: la muqueuse est divisée en cellules basales et superficielles et est en général caractérisée par une abondance de granules de mucus (—→). Après action de l'ocytocine, les espaces intercellulaires sont très dilatés; après 10 minutes de traitement aux Cémulsols, cet effet n'est pas en-



core disparu. Colorer par la triple coloration thionine-azur B-fuschine.

X 2000

11. Epithélium vésical traité au NPT-6, 1000  $\gamma$ /1 h.25.  
Vessie contractée; les agrégats caractéristiques de granules de mucus ( $\longrightarrow$ ) sont mieux observables. Triple coloration thionine-azur B-fuschine.

X 2000

12. Epithélium de contrôle ayant subi deux stimulations à l'ocytocine. Aspect semi-contracté du tissu; les granules de sécrétion forment une mince ligne immédiatement sous-jacente à la membrane plasmique. Coloration thionine-azur B-fuschine.

X 2000

13. Apparence générale d'épithélium vésical traité au NPT-6  
1000  $\gamma$ /ml, 1 h.25.

La vessie est dans un état contracté. Adjacents aux microvil-  
li, les agrégats de granules de sécrétion ( $\longrightarrow$ ) sont nom-  
breux et très denses. Dans tous les noyaux, hétéro et euchro-  
matine sont facilement différenciées. Les espaces intercel-  
lulaires sont dilatés mais on devine les interdigitations.  
Coloration à la fuschine basique.

X 2000

## 14-15. Action zonale du Cémulsol NPT-10.

Toutes les cellules de la couche superficielle sont atteintes; certaines ne sont que peu altérées, d'autres très pâles et d'autres complètement lysées. Les microvilli sont plus rares et paraissent allongés. Noter l'oedème général des cellules pâles; l'hyaloplasme et le nucléoplasme sont très clairs. Dans les cellules les moins atteintes les granules de sécrétion sont très denses, peu nombreux et volumineux.

X 2000

## D- Micrographies de la membrane apicale des épithéliums témoins et traités.

## 16. Épithélium vésical contrôle.

Noter l'importance de la couche colorée à la surface apicale de l'épithélium, couche extracytoplasmique filamenteuse. Les granules de sécrétion sont immédiatement sous-jacents à cette couche filamenteuse.

X 27060

## 17-18. Épithélium vésical contrôle.

Membrane plasmique apicale visible (—→), coat extracytoplasmique abondant; les granules de sécrétion pâles, membrane limitante visible.

X 40590

19-20. Microvilli My d'épithélium vésical traité au détergent NPT-6, 1000  $\gamma$ /ml, 10 min.

Noter la bonne conservation de la membrane plasmique apicale (—→) et le granule de sécrétion plus dense, d'aspect granuleux.

X 94710

21. Cellule épithéliale traitée au détergent NPT-6, 1000  $\gamma$ /ml, 1 h.25.

Remarquer la bonne conservation de la double membrane apicale (—→).

X 94710

22. Tissu traité au NPT-10, 250  $\gamma$ /ml, 5 minutes.

La double membrane est toujours bien définie. Les systèmes jonctionnels sont bien préservés: barre terminale Bt et zonula adherens. Noter l'élargissement de l'espace intercellulaire qui semble rempli d'un matériel amorphe; dans la matrice cytoplasmique se trouvent deux bandes nettes de matériel dense longeant la membrane cellulaire.

X 94710

23. Epithélium vésical traité au NPT-10, 1000  $\gamma$ /ml, 5 minutes.

Ici également, malgré l'action drastique du détergent, doubles membranes (—→) et jonctions intercellulaires sont préservées.

X 94710

E- Micrographies des lésions cytoplasmiques.

24.           Epithélium vésical traité au NPT-10, 10 minutes.

Cellule presque lysée: le coat est rarifié, les microvilli allongés sont rares, les mitochondries ont un aspect fripé mais peuvent encore être reconnues. Noter les nombreuses vacuoles claires, les corps myéliniques et les granules très denses.

X 38745

25.           Cellule très dense du même épithélium montrant encore quelques organites.

Les espaces intercellulaires sont très agrandis mais les barres terminales sont toujours intactes.

X 11070

26.           Cellule épithéliale traitée au Cémulsol NPT-6, 1000  $\gamma$ /ml, 1 h.25.

La membrane plasmique de cette cellule est toujours intacte mais le coat est moins abondant. Plusieurs corps myéliniques sont observés; les granules de sécrétion sont très denses; Le noyau est de forme allongée; on y distingue facilement les mottes chromatiniennes. La membrane nucléaire est bien visible.

X 40590

27. Cellule épithéliale traitée au Cémulsol NPT-10, 1000  $\gamma$ /ml.  
La membrane plasmique est toujours intacte; les mitochondries et granules de sécrétion sont dégradés en images myéliniques; le noyau N possède une chromatine dispersée uniformément, très volumineuse. Noter l'oedème général de la cellule; la matrice cytoplasmique très claire, permet d'observer le matériel fibrillaire ( $\longleftrightarrow$ ).

X 16605

- 28-29. Même cas avec lésions membranaires ( $\longleftrightarrow$ ); les jonctions cellulaires sont préservées; le cytoplasme, très pâle, ne contient plus que des amas membranaires; les organelles sont vacuolisés. Dans ces cellules lysées, la trame fibrillaire est particulièrement visible. Remarquer les fibres conjonctives.

X 16605

F- Micrographies de l'atteinte des granules sécrétoires.

30. Granules de sécrétion de tissu de contrôle.  
Matrice très pâle, granule arrondi et membrane limitante adjacente à la matrice.

X 94710

31. Granules de sécrétion de tissu traité au NPT-6, 1000  $\gamma$ /ml, 10 minutes.  
Matrice dense et arrondie; membrane limitante légèrement ondulée et décollée.

X 94710



- 32-33. Détails de granules de sécrétion traités au NPT-6, 1000  $\gamma$ /ml, 1 h.25.

La matrice est légèrement ovoïde, remplie d'un matériel apparemment granuleux:renfermant une inclusion dense, excentrique.

X 94710

- 34-35. Granules de sécrétion de tissu traité au NPT-10, 250  $\gamma$ /ml, 10 minutes.

Ils possèdent une inclusion centrale très dense, bordée d'un halo plus pâle.

X 7500

36. Granules de sécrétion de tissu traité par 1000  $\gamma$ /ml de NPT-10, 10 minutes.

Observables dans les cellules les moins atteintes. Noter inclusion centrale dense et le halo plus pâle.

X 7500

37. Autre type de granules rencontré dans le tissu traité au NPT-10, 250  $\gamma$ /ml, 10 minutes.

Matrice très pâle; matériel légèrement granuleux; membrane ondulée mais adhérent à la matrice.

X 94710

G- Micrographies des mitochondries.

38. Mitochondries de tissu de contrôle.  
Matrice dense, crêtes mitochondriales pâles et bien définies;  
les grana intramitochondriaux peuvent être observés.  
X 38745
39. Mitochondrie de tissu traité au NPT-6, 1000  $\gamma$ /ml, 10 minutes.  
Matrice mitochondriale et cytoplasmique uniformément dense.  
Les crêtes mitochondriales sont moins bien définies.  
X 94710
- 40-41. Amas mitochondriaux dans une cellule de tissu traité au NPT-  
10, 250  $\gamma$ /ml, 10 minutes.  
Aspect fripé des mitochondries; crêtes mal définies; forme  
irrégulière.  
X 12215, X 38745
- 42-43. Amas mitochondrial d'une cellule traitée au NPT-10, 1000  $\gamma$ /ml,  
10 minutes.  
Mitochondries dégradées en images myéliniques.  
X 94710

